

**Studies of Intestinal Permeability and Hepatic
Metabolism of
dl-Praeruptorin A and *d*-Praeruptorin A *In Vitro***

by

Jing, Wanghui



Institute of Chinese Medical Sciences

University of Macau



STUDIES OF INTESTINAL PERMEABILITY AND HEPATIC METABOLISM OF
dl-PRAERUPTORIN A AND *d*-PRAERUPTORIN A IN VITRO

by

Wang-Hui, Jing

A thesis submitted in partial fulfillment of the
requirements for the degree of

Master of Science

Institute of Chinese Medical Sciences
University of Macau

2010

Approved by _____

Supervisor

Date _____



In presenting this thesis in partial fulfillment of the requirements for a Master's degree at the University of Macau, I agree that the Library and the Institute of Chinese Medical Sciences shall make its copies freely available for inspection. However, reproduction of this thesis for any purposes or by any means shall not be allowed without my written permission. Authorization is sought by contacting the author at

Address:

Telephone:

E-mail:





碩士學位論文

白花前胡甲素和白花前胡丙素的體外 吸收及肝代謝研究

研究生姓名： 景王慧
導 師： 王一濤 教授
 燕 茹 博士
專 業： 中藥學
日 期： 2010.8



澳門大學中華醫藥研究院



致謝

首先衷心感謝我的導師王一濤教授，給予我在澳門大學中華醫藥研究院攻讀碩士學位的機會，並在實驗和生活上給予我的指導和幫助，讓我度過了兩年美好而充實的時光。

衷心感謝我的另一位指導導師燕茹博士，從課題的設計到論文的完成無不傾注了燕茹博士的心血。燕茹博士嚴謹的治學態度，踏實的工作作風以及平易近人和寬厚待人的品格給我留下了深刻的印象，將令我受益終生。在此，再次向我的兩位導師王一濤教授和燕茹博士表示衷心的感謝和深深的敬意！

感謝本課題組趙海譽博士、畢惠嫦博士在實驗操作及實驗設計等方面給予的指導和幫助。

感謝兩年來教育和指導過我的李紹平教授、李銘源副教授、張慶文博士、鄭穎博士、許貝文博士，他們給過我的幫助及傳授給我的專業知識及科研態度令我終生難忘。

特別感謝博士生宋月林師兄，在實驗操作及試驗結果的分析上給予的耐心指導和幫助，是他讓我能夠順利完成對代謝產物定性分析和酶動力學部分的實驗。感謝阮建清同學在我實驗中給予的支援和幫助，感謝張聞師弟在我參加會議期間，給予實驗上的幫助。感謝梁永炎、梅梅、周瑞娜、吳文進、蔡羽為實驗所提供的幫助。

感謝 Sandy Lao, Leon Lai, Wing Leong, Hattie U 及 Chole Lao 對我各項工作的支持。

感謝父母的養育之恩，他們總是在精神上和物質上給予我全力的支持，使我的學業順利完成，女兒在此衷心的感謝你們！



University of Macau

ABSTRACT

STUDIES OF INTESTINAL PERMEABILITY AND HEPATIC METABOLISM OF *dl*-PRAERUPTORIN A AND *d*-PRAERUPTORIN A IN VITRO

By wang-hui, Jing

Supervisor: Prof. Yi-tao, Wang

Dr. Ru, Yan

Keywords: *dl*-praeruptorin A; *d*-praeruptorin A; Caco-2 monolayers; absorption; liver microsomes; metabolism; enzyme kinetics

Qian-hu (Radix Peucedani), the dry roots of *peucedanum praeruptorum* Dunn, has been used for treatments of certain respiratory disorders such as cough and asthma, and pulmonary hypertension for centuries. The extract of Qian-hu is able to relax tracheal and pulmonary arterial preparations. *dl*-Praeruptorin A (*dl*-PA) and *d*-praeruptorin A (*d*PA) are two main bioactive constituents of the herb and *dl*-PA was also documented as the chemical marker for quality control of Qian-hu in China Pharmacopoeia. *d*PA is dextrorotatory enantiomer with two chiral centers, *dl*-PA is the racemate of *d*PA. Modern pharmacologic studies demonstrated that both *dl*-PA and *d*PA exhibited strong bioactivities, especially the cardiovascular protective effect. Recently, one literature reported that *d*PA showed more potent relaxation than its antipode *l*-praeruptoin A (*l*PA) on phenylephrine-induced contraction of rat isolated aortic rings with intact endothelium. However, there is no pharmacokinetics report on Qian-hu or its main bioactive constituents, thus the pharmacokinetic basis of the actions of the herb remains to be addressed. The present study aims to elucidate the intestinal transport mechanism as well as the hepatic metabolic stability of *dl*-PA and *d*PA using *in vitro* models, which will help to understand the *in vivo* fates of the main

constituents of the herb and provide important information for a systemic pharmacokinetic evaluation of Qian-hu ongoing in our laborlaboratory. In addition, the present study provides preliminary data on chiral discrimination, if any, in ADME properties by comparing *in vitro* absorption and metabolism of *dl*-PA and *d*PA .

The bi-directional transports of *dl*-PA and *d*-PA were studied in the Caco-2 cell monolayer model and quantified by chiral-HPLC/UV. The identification of the metabolites which were generated in the caco-2 model was carried out by LC-MS/MS. For the metabolism part, it was investigated by incubation *dl*-PA and *d*-PA with human liver microsomes (HLMs) and rat liver microsomes (RLMs). For comparing the metabolic stability of *dl*-PA and *d*PA and species difference, the generated metabolites were identified by LC-MS/MS and quantified by HPLC/UV.

The bi-directional transport study showed that both *dl*-PA and *d*PA are mainly transported via transcellular pathway by passive diffusion with the $P_{app} > 10^{-5}$; there is no stereoselectivity of *d*PA and *l*PA in racemate during the transport process. In addition, during the transport of *dl*-PA and *d*PA, their recoveries were low, especially for *dl*-PA (60-70%). Further study the binding ratio of *dl*-PA, the results showed that 10% non-specific binding to Transwell™ membrane, other 10% irreversible binding to cellular components during transport were demonstrated to contribute to the loss with no stereoselectivity binding. In addition, two new metabolites, which have the same molecular weight but different retention time, were detected from the bi-directional transport studies of *dl*-PA not *d*PA on Caco-2 monolayer. They were identified to be the hydrolysis of *dl*-PA at 4' position by LC-MS/MS. And further enzyme inhibition study of *dl*-PA on the Caco-2 cell monolayers showed that this metabolism was mediated by hCE-1.

For the *in vitro* liver metabolism part, either *dl*-PA or *d*PA could produce phase I metabolites. 12 metabolites could be detected when *dl*-PA was incubated with RLMs, and 9 metabolites formed with HLMs. Different with *dl*-PA, 12 metabolites could be detected when *d*PA was incubated with RLMs, while 6 metabolites formed with

HLMs. All the metabolites were identified by LC-MS/MS, and the result showed that all metabolisms occurred at the 3' and/or 4' position but not on the coumarin ring, with oxidation and hydrolysis the two predominant pathways.

Enzyme kinetics of *dPA* in liver microsomes was studied. M1 which is the major metabolite of *dPA* in HLMs was isolated by wet chemistry method and silica gel column chromatography. A HPLC-MRM method was established for this study. Further more, the isoenzymes which were involved in the metabolism of *dPA* was identified by chemical inhibition, idiosyncratic antibody inhibition and recombinase screening.

In conclusion, *dl-PA* and *dPA* could be readily transported across Caco-2 cell monolayer by passive diffusion. *dl-PA* could be metabolized by carboxylesterases in Caco-2 cells. *dl-PA* and *dPA* are subjected to extensive phase I metabolism in liver microsomes. They separately exhibited the species differences and enantiomers metabolism differences in the same liver microsomes. Those results could provide important reference for further studying the *in vivo* pharmacokinetics of *peucedanum praeruptorum* Dunn or *dl-PA* and *dPA*.



澳門大學

摘要

白花前胡甲素和白花前胡丙素體外吸收及肝代謝研究

景王慧

指導老師：王一濤 教授 燕茹 博士

中華醫藥研究院

關鍵詞：白花前胡甲素，白花前胡丙素，Caco-2 單層細胞模型，肝微粒體，代謝，酶動力學

中藥前胡為傘形科植物白花前胡 *Peucedanum praeruptorum* Dunn 的乾燥根，具有散風清熱，降氣化痰的作用，臨床上用於風熱咳嗽痰多，痰熱喘滿等癥。白花前胡甲素（以下簡稱甲素）及白花前胡丙素（以下簡稱丙素）為前胡中主要成份。甲素具有兩個手性中心，為消旋體，兩光學異構體均為順式構型，是中國藥典規定的中藥前胡的品質控制的指標成分，丙素為其右旋異構體，為順式構型。現代藥理研究表明，此兩種成份均具有較強的生物活性，尤以降壓、抗心衰、抗心肌缺血等心血管活性為顯著。最近研究發現，在舒張血管活性方面右旋體的作用強於其左旋對映異構體。然而，至今未見有關中藥前胡及其主要成分的藥動學研究報導，並且對其發揮體內效應的機制尚不清楚。本研究通過研究前胡主要成分白花前胡甲素和丙素的體外吸收及代謝機制，旨在預測其體內動態變化過程及主要影響因素，為本研究組正在展開的前胡體內藥動學及藥效學系統評價提供重要的實驗參考；此外，通過比較消旋體與右旋對映體的吸收及代謝差異，初步

揭示甲素和丙素的結構上的區別可能導致的體內過程差異。

在 Caco-2 單層細胞模型上研究甲素及丙素的雙向（從腸腔側（AP 側）到達基底側（BL 側）和從基底側外排到腸腔側）轉運及分子機制，採用手性 C₁₈ 柱對甲素和丙素進行 HPLC/UV 定量分析，LC-MS/MS 進行代謝產物的鑒定分析；採用大鼠及人肝微粒體體外孵育法，比較研究甲素和丙素的肝臟代謝穩定性及種屬差異。定量分析採用 HPLC/UV，代謝產物鑒定採用 LC-MS/MS。

透過實驗的結果表明，甲素及丙素的體外吸收均主要通過被動擴散，較易透過 ($P_{app} > 10^{-5}$) Caco-2 細胞單層，其表觀滲透係數隨濃度升高而降低；甲素的兩個手性對映體的透過無明顯立體選擇性。在 Caco-2 透過實驗中，甲素及丙素的回收率均較低（大概的數值），並且甲素的回收率低於丙素。進一步對甲素進行膜結合研究，發現約 10% 的甲素與空白碳酸酯膜結合，另有約 10% 的藥物與甲醇處理過的細胞膜非特異結合，沒有發現甲素的左旋體和右旋體存在結合的立體選擇性。此外，甲素在透過 Caco-2 細胞單層過程中發生水解，產生兩個代謝產物（M1 和 M2），但單獨的丙素在透過 Caco-2 細胞單層過程中並未檢測到任何代謝產物。利用 LC-MS/MS 進行定性分析，確定 M1 和 M2 為甲素在 4' 位酯鍵水解產生的同分異構體，通過觀察酯酶抑制劑對甲素在透過過程中代謝的影響，明確了催化甲素生成 M1 和 M2 的酶為羧基酯酶。

通過體外溫孵實驗，發現白花前胡甲素和丙素在大鼠及人肝微粒體中均發生較為強烈的一相代謝。甲素在大鼠肝微粒體中產生 12 個代謝產物，而在人肝微粒體中產生了 9 個代謝產物；丙素在大鼠和人肝微粒體中則分別產生 12 個和 6 個代謝產物。對代謝產物進行 LC-MS/MS 定性分析，發現代謝均發生在甲素或

丙素的 3' 和/或 4' 位側鏈上，代謝反應類型為水解和/或氧化，沒有發生骨架凱琳內酯的開環或氧化。

同時，我們進行了 *dPA* 在人肝微粒體中酶動力學的相關研究。其主要代謝產物 M1 通過濕化學法和矽膠柱色譜分離得到。進而我們建立了適合於酶動力學研究的高效液相串聯多反應監測模式的分析方法。為了得到人肝微粒體中相應的 K_m 和 V_{max} 值，我們採用一系列的底物濃度在有 NADPH 系統參與下與人肝微粒體共孵育 20 分鐘。參與白花前胡丙素代謝的異構酶的確定，我們通過化學抑制劑、特異性的抗體和重組酶篩選來共同佐證。結果顯示：CYP 3A4、2C19 和 2B6 是參與其代謝的主要酶亞型。

總之，白花前胡甲素和丙素均主要以被動擴散的形式快速通過 Caco-2 細胞單層，且在吸收過程中白花前胡甲素在羧酸酯酶介導下發生了水解。此外，白花前胡甲素和丙素的體外肝臟代謝存在種屬差異，而白花前胡甲素及丙素在同一種屬的肝微粒體的代謝表現出立體差異。以上研究結果為進一步研究中藥前胡及主要成分甲素和丙素的體內過程及影響因素提供了重要參考。



縮略語中英文對照表

縮寫	英文全稱	中文全稱
AP	Apical side	頂側面
BL	Basolateral side	基底外側面
CES	carboxylesterase	羧酸酯酶
Cl _{int}	Intrinsic clearance	清除率
<i>dl</i> -PA	<i>dl</i> -praeruptorin A	白花前胡甲素
<i>d</i> PA	<i>d</i> -praeruptorin A	白花前胡丙素
<i>dl</i> -PB	<i>dl</i> -praeruptorin B	白花前胡乙素
<i>d</i> PB	<i>d</i> -praeruptorin B	白花前胡丁素
<i>d</i> PE	<i>d</i> -praeruptorin E	白花前胡 E 素
DAD	Diode Array Detector	二極體陣列檢測器
DMSO	Dimethyl Sulfoxide	二甲基亞砜
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium	DMEM 培養基
ESI	Electrospray Ionization	電噴霧離子化
FBS	Fetal Bovine Serum	胎牛血清
HBSS	Hanks' balanced salts	Hank 平衡鹽溶液
hCE-1	Human carboxylesterase-1	人類 CES-1 家族同工酶
hCE-2	Human carboxylesterase-2	人類 CES-2 家族同工酶
HLMs	Human liver microsomes	人肝微粒體
HPLC	High performance liquid chromatography	高效液相色譜
K _m	Substrate concentration at 1/2 V _{max}	米氏常數
LC-MS	Liquid chromatography—Mass spectrometry	液相色譜-質譜聯用
LOD	Limits of detection	檢測限
LOQ	Limits of quantification	定量限
MTT	3-(4, 5-dimethyl-2-thiazoyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide	噻唑藍

MRP	Multidrug Resistance-associated Protein	多重耐藥蛋白
MS	Mass spectrometry	質譜
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸鹽緩衝液
P-gp	P-glycoprotein	P-糖蛋白
P_{app}	Apparent permeability coefficient	表觀穿透係數
RLMs	Rat liver microsomes	大鼠肝微粒體
RSD	Relative standard deviation	相對標準偏差
SD	Standard deviation	標準偏差
TEER	Transepithelial electrical resistance	上皮通過電阻
UV	Ultraviolet	紫外
Vmax	Maximum enzyme reaction velocity	最大反應速率



目錄

致謝	I
ABSTRACT	III
摘要	錯誤! 尚未定義書籤。
縮略語中英文對照表	XI
目錄	XIII
第一章 研究背景	1
第一節 白花前胡的化學成分研究進展	1
第二節 白花前胡的藥理活性研究進展	3
1 白花前胡药材的藥理活性	3
2 白花前胡甲素的藥理活性	4
3 白花前胡丙素的藥理活性	5
第三節 手性化合物的藥動學研究	7
1 手性藥物研究現狀及前景	7
2 藥物的手性對其吸收、分佈、代謝、排泄的影響	8
第四節 研究藥物體外吸收和代謝的主要模型	10
1 Caco-2細胞單層腸吸收模型	10
2 體外肝微粒體代謝模型	12
第二章 白花前胡甲素及丙素體外吸收機制研究	14
第一節 白花前胡甲素的手性分離	14
1 實驗材料與儀器	14
2 方法	15
3 結果與討論	15
4 小結	18
第二節 白花前胡甲素體外吸收機制的研究	19
1 實驗材料與儀器	19
2 方法	20
3 結果與討論	24
4 小結	31

第三節 白花前胡丙素體外吸收機制的研究	32
1 實驗材料與儀器	32
2 方法	32
3 結果與討論	32
4 小結	35
第四節 <i>dl</i> -PA在Caco-2 細胞模型中代謝機制研究	36
1 實驗材料與儀器	36
2 方法	36
3 結果與討論	37
4 小結	40
第三章 白花前胡甲素及丙素體外代謝研究	42
第一節 白花前胡甲素在大鼠及人肝微粒體中的代謝	42
1 實驗材料與儀器	42
2 方法	43
3 結果與討論	44
4 小結	55
第二節 白花前胡丙素在大鼠及人肝微粒體中的代謝	56
1 實驗材料與儀器	56
2 方法	56
3 結果與討論	56
4 小結	63
第三節 白花前胡甲素和丙素在兩種不同肝微粒體中代謝反應的比較分析	64
1 定性比較白花前胡甲素及丙素在肝微粒體中的代謝	64
2 定量比較白花前胡甲素及丙素在肝微粒體中的代謝差異	65
3 小結	67
第四章 白花前胡丙素的酶動力學研究	69
第一節 白花前胡代謝產物M1的分離	69
1 實驗材料與儀器	69
2 方法	69

3 結果與討論.....	70
第二節 白花前胡丙素酶動力學方法的建立.....	71
1 實驗材料與儀器.....	71
2 方法.....	71
3 結果.....	73
4 小結.....	75
第三節 白花前胡丙素在HLMs中酶動力學研究.....	76
1 實驗材料與儀器.....	76
2 方法.....	76
3 結果.....	76
4 小結.....	79
第四節 白花前胡丙素在HLMs中參與代謝酶亞型的篩選.....	80
1 實驗材料與儀器.....	80
2 方法.....	80
3 結果與討論.....	81
4 小結.....	85
第五章 總結與展望.....	86
第一節 總結.....	86
第二節 研究展望.....	87
參考文獻.....	88
攻讀學位期間完成的學術文章.....	96
獲得的獎勵.....	96